

EVENTOS DE SPLICING ALTERNATIVO ASSOCIADOS AO ESTRESSE SALINO EM PLANTAS DE ARROZ

MARCELO NOGUEIRA DO AMARAL¹; LUIS WILLIAN PACHECO ARGE²;
LETÍCIA CARVALHO BENITEZ^{2*}; GABRIELA PERES MORAES²; LUCIANO
CARLOS DA MAIA²; EUGENIA JACIRA BOLACEL BRAGA³

¹ Universidade Federal de Pelotas – theoamaral@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas

³ Universidade Federal de Pelotas – jacirabraga@hotmail.com

*Auxílio financeiro CAPES/FAPERGS

1. INTRODUÇÃO

A salinidade é um dos principais estresses abióticos que afetam o crescimento e desenvolvimento das plantas, causando importantes reduções na produtividade (MUNNS; TESTER, 2008). Muitas das respostas ao estresse salino envolvem mudanças na expressão de um grande número de genes, bem como regulações pós-transcricionais (DING et al., 2014).

O *Splicing* Alternativo (AS) é um processo pós-transcricional que gera dois ou mais variantes de mRNA de um único gene, aumentando a diversidade de proteínas pela inclusão ou exclusão de sequências de peptídeos (domínios), e a modulação da expressão do gene através da produção de variantes de mRNA em eucariotos (YOSHIMURA et al., 2011). Eventos de *Splicing* Alternativo estão envolvidos em diversos processos fisiológicos, incluindo respostas aos estresses abióticos e bióticos (BARBAZUK et al., 2008). Em respostas aos estresses ambientais, o AS afeta uma série de genes reguladores, os quais provavelmente estão envolvidos no processo de adaptação das plantas a condições adversas. Esses genes incluem as *MAPKs* (Proteínas Quinases ativadas por mitógenos); alguns fatores de transcrição, por exemplo, *MYB* e *CBF/DREB*; e proteínas Serina/Arginina (SR), que são importantes reguladores do SA, tanto no desenvolvimento da planta, quanto em respostas ao estresse (DUBROVINA et al., 2013).

Durante o processamento do pré-mRNA, o spliceossoma, um complexo de RNA-Proteína, ao reconhecer dinucleotídeos específicos nos sítios 3' e 5' (sítios de junção), excisam sequências não-codificantes e unem as sequências codificantes (HOSKIS; MOORE, 2012). Segundo WANG et al. (2010), esses sítios de junção podem ser do tipo Canônico (dímeros GT-AG), Semi-Canônico (dímeros AT-AC ou GC-AG) ou Não-Canônicos (outros dímeros). Dentre os eventos de AS existem quatro principais tipos que utilizam junções Canônicas: pulo de *exon* (*exon skipping*), sítios alternativos 3' e 5' de *splice* e retenção de *intron* (REDDY, 2007). Entretanto, a ocorrência desses eventos pode variar de acordo com o genótipo, com o tipo de tecido e com a condição de estresse (VITULO et al., 2014).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os tipos de junções e eventos de *Splicing* Alternativo no transcriptoma de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) da cultivar BRS Querência sob condições normais e de estresse salino.

2. METODOLOGIA

Sementes de arroz cv. BRS Querência foram germinadas em câmara de crescimento durante 7 dias. Após esse período, as plântulas foram transferidas para bandejas plásticas (1L) contendo areia previamente lavada, e mantidas em casa de vegetação com irrigação alternada (intervalos de 2 dias) com solução nutritiva de Yoshida (YOSHIDA et al., 1976) e água. Ao atingirem o estágio V4 as plantas foram submetidas ao estresse salino com solução nutritiva adicionada de 150 mM de NaCl durante 24 horas, e o controle apenas com solução nutritiva. Posteriormente, tecidos foliares foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer à -80°C para posterior extração de RNA.

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de folhas utilizando *Plant RNA Reagent Purelink*®. Para o preparo das bibliotecas foi utilizado o kit *TruSeq RNA Sample Preparation v2* (Illumina®), seguindo as recomendações do fabricante. O sequenciamento das bibliotecas foi do tipo *paired-end 2x100 reads* (duas leituras de 100 pb) realizado na plataforma *HiSeq 2500* (Illumina®).

Para a visualização e identificação da qualidade dos *reads*, foi utilizado o software FastQC Ver. 0.11.2 (ANDREWS, 2010) e, após o software Trimmomatic Ver. 0.32 (BOLGER et al., 2014) foi utilizado para a remoção das bases com baixa qualidade e dos adaptadores de cada biblioteca. Após, as *reads* foram mapeadas no genoma de referência de *Oryza sativa* Nipponbare (IRGSP build 4.0) através do programa TopHat 2.0.11 (TRAPNELL et al., 2009). Após o alinhamento, os softwares MapSplice (WANG et al., 2010) e SpliceGrapher (ROGERS et al., 2012) foram utilizados para análise dos sítios de junção e eventos de *Splicing* Alternativo, respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Tabela 1, tanto a condição controle como a de estresse, apresentaram maiores porcentagens de sítios de junção do tipo Canônico (98,85% e 98,76%, respectivamente), em relação aos tipos Semi-Canônicos (0,73% e 0,77%), e Não-Canônicos (0,42% e 0,47%). Resultados semelhantes foram encontrados por VITULO et al. (2014) ao estudarem sítios de junção em Videira (*Vitis vinífera* L.), onde obtiveram 97,5% de sítios de junção com dímeros GT-AG (Canônico), 1,0% GC-AG (Semi-Canônico) e 1,5% com outros dímeros (Não-Canônico). E análises nos sítios 3' e 5' de *Splicing* em *Arabidopsis thaliana* e Arroz, revelaram que os dímeros GT-AG ocorrem com maior frequência (REDDY, 2007). Entretanto, não houve diferenças entre o controle e o estressado.

Tabela 1 - Números de sítios de junção de *Splicing* Alternativo em folhas de arroz submetidas a 150 mM de NaCl durante 24 horas

Condição	Tipos de sítios de junção			Total
	Canônico	Semi-Canônico	Não-Canônico	
Controle	126309 (98,85%)	937 (0,73%)	535 (0,42%)	127781
Sal	132796 (98,76%)	1042 (0,77%)	632 (0,47%)	134470

Já para os eventos de *Splicing* Alternativo do tipo Canônico, a amostra estressada apresentou números maiores, totalizando 25048 eventos, enquanto que a amostra controle apresentou 23307. Porém, em ambos os tratamentos, a Retenção de *Intron* foi o evento de maior ocorrência, com 10281 (44,1%) eventos para a amostra controle e 10398 (41,5%) para a amostra estressada (Tabela 2).

Esses resultados são consistentes com outros estudos, apoiando a ideia de que a Retenção de *Intron* é o evento mais comum em plantas (VITULO et al., 2014). Eventos de Retenção de *Intron* podem levar a produção de mRNAs com *stop códon* prematuro (PTCs), podendo ocorrer a formação de proteínas truncadas. A formação dessas proteínas truncadas pode ter um alto gasto energético para a célula, portanto esses PTCs são degradados antes de chegarem ao ribossomo (MASTRANGELO et al., 2012). Entretanto, alguns estudos demonstram que as proteínas truncadas realizam funções importantes na adaptação das plantas às condições de estresse (MATSUKURA et al., 2010).

Tabela 2 - Eventos de *Splicing* Alternativo do tipo Canônico em folhas de arroz submetidas a 150 mM de NaCl durante 24 horas

Condição	Retenção de <i>Intron</i>	Pulo de <i>Exon</i>	5' Alternativo	3' Alternativo	Total
Controle	10281 (44,1%)	4413 (18,9%)	3352 (14,4%)	5261 (22,6%)	23307
Sal	10398 (41,5%)	5071 (20,2%)	3797 (15,2%)	5782 (23,1%)	25048

Por outro lado, o uso alternativo de sítios 5' foi o evento mais raro para ambos tratamentos, ocorrendo 3352 (14,4%) vezes no controle e 3797 (15,2%) na estressada.

4. CONCLUSÕES

Apesar de poucas diferenças entre plantas controle e estressadas, o *Splicing* Alternativo parece ter fundamental importância na elucidação de mecanismos de adaptação ao estresse, podendo ajudar na identificação de transcritos para serem usados na engenharia genética bem como no desenvolvimento de marcadores para seleção de plantas tolerantes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, S. **Fastqc. a quality control tool for high throughput sequence data**. Babraham Bioinformatics. Acessado em: 20 de março de 2014. Online. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

BARBAZUK, W.B.; FU, Y.; MCGINNIS; K.M. Genome-wide analyses of alternative splicing in plants: opportunities and challenges. **Genome Research**, Estados Unidos, v.18, n.1, p.1381-1392, 2008.

BOLGER, A.M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, Reino Unido, v.30, n.15, p.2114-2120, 2014.

DING, F.; CUI, P.; WANG, Z.; ZHANG, S.; ALI, S.; XIONG, L. Genome-wide analysis of alternative splicing of pre-mRNA under salt stress in *Arabidopsis*. **BMC Genomics**, Reino Unido, v.15, n.431, p.1-14, 2014.

DUBROVINA, A.S.; KISELEV, K.V.; ZHURAVLEV, Y.N. The Role of Canonical and Noncanonical Pre-mRNA Splicing in Plant Stress Responses. **BioMed Research International**, Estados Unidos, v.2013, n.1, p.1-14, 2013.

HOSKINS, A.A.; MOORE, M.J. The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine, **Trends in Biochemistry Science**, Inglaterra, v.37, n.5, p.179-188, 2012.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, Estados Unidos, v.59, n.1, p.651-681, 2008.

MASTRANGELO A.M.; MARONE, D.; LAIDÒ, G.; DE LEONARDIS, A.M.; DE VITA, P. Alternative splicing: enhancing ability to cope with stress via transcriptome plasticity. **Plant Science**, Irlanda, vol.185, n.1, p. 40-49, 2012.

MATSUKURA, S.; MIZOI, J.; YOSHIDA, T.; TODAKA, D.; ITO, Y.; MARUYAMA, K.; SHINOZAKI K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Comprehensive analysis of rice *DREB2* type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. **Molecular Genetics and Genomics**, Alemanha, v.283, n.2, p.185-196, 2010.

REDDY A.S.N. Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. **Annual Review of Plant Biology**, Estados Unidos, v.58, n.1 p.267-294, 2007.

ROGERS, M.F.; THOMAS, J.; REDDY, A.S.N.; BEN-HUR, A. SpliceGrapher: Detecting patterns of alternative splicing from RNA-seq data in the context of gene models and EST data. **Genome Biology**, Reino Unido, v. 13, n.4, p.1-17, 2012.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S.L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, Reino Unido, v. 25, n. 9, p. 1105-1111, 2009.

VITULO, N.; FORCATO, C.; CARPINELLI, E.C.; TELATIN, A.; CAMPAGNA, D; D'ANGELO, M.; ZIMBELLO, R.; CORSO, M.; VANNOZZI, A.; BONGHI, C.; LUCCHIN, M; VALLE, G. A deep survey of alternative splicing in grape reveals changes in the splicing machinery related to tissue, stress condition and genotype. **BMC Plant Biology**, Reino Unido, v.14, n.99, p.1-16, 2014.

WANG, K.; SINGH, D.; ZENG, Z.; COLEMAN, S.J.; HUANG, Y.; SAVICH, G.L.; HE, X.; MIECZKOWSKI, P.; GRIMM, S.A.; PEROU, C.M; MACLEOD, J.N.; CHIANG, D.Y.; PRINS, J.F.; LIU, J. MapSplice: Accurate mapping of RNA-seq reads for splice junction discovery. **Nucleic Acids Research**, Reino Unido, v.38, n.18, p.1-14, 2010.

YOSHIDA, S.; FORNO, D.A.; COCK, J.H.; GOMEZ, K.A. **Laboratory manual for physiological studies of rice**. The Philippines: International Rice Research Institute (IRRI), 1972. 3v.

YOSHIMURA, K.; MORI, T.; YOKOYAMA, K.; KOIKE, Y.; TANABE, N.; SATO, N.; TAKAHASHI, H.; MARUTA, T.; SHIGEOKA, S. Identification of Alternative Splicing Events Regulated by an *Arabidopsis* Serine/Arginine-Like Protein, *atSR45a*, in Response to High-Light Stress using a Tiling Array. **Plant and Cell Physiology**, Reino Unido, v.52, n.10, p.1786-1805, 2011.